

# 肝動脈塞栓後の肝細胞癌における Bcl-2 蛋白・血管内皮増殖因子共発現-hypoxia, reoxygenation による Bcl-2 発現誘導の可能性

著者	小林 直
号	3123
発行年	1998
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/21863">http://hdl.handle.net/10097/21863</a>

氏 名（本籍）                      小                      林                      直

学 位 の 種 類                      博                      士                      （ 医                      学 ）

学 位 記 番 号                      医                      第                      3 1 2 3                      号

学位授与年月日                      平 成 10 年 9 月 9 日

学位授与の条件                      学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴                      昭 和 63 年 3 月  
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目                      肝動脈塞栓後の肝細胞癌における Bcl-2 蛋白・血  
管内皮増殖因子共発現－hypoxia, reoxygenation  
による Bcl-2 発現誘導の可能性

（主 査）

論 文 審 査 委 員                      教授 豊 田 隆 謙                      教授 堀 井                      明

教授 金 丸 龍之介

# 論文内容要旨

## 【研究目的】

肝動脈塞栓療法（TAE）は hypoxia により肝細胞癌（HCC）の癌細胞を細胞死に陥らせる。臨床的に TAE には、高い局所再発率、腫瘍の性質の変化、術前 TAE による生存率の悪化などの問題が存在するが、その原因は不明である。もし TAE 後に生き残った癌細胞に DNA 障害を持った細胞の生存を延長させる蛋白が発現されれば、これらの問題を説明しうる。Bcl-2 蛋白はアポトーシスを阻害し、hypoxia による細胞死を阻止する。癌における役割としては、DNA の損傷を受けた細胞に Bcl-2 蛋白が発現するとアポトーシスを免れ生き残り、oncogenic mutation を集積すると推測されている。そこで本研究では、以下の検討を目的とした。TAE による Bcl-2 蛋白の発現の可能性を、TAE 後の手術標本を用い免疫組織学的に検討する。また HCC では hypoxia により血管内皮増殖因子（VEGF）の発現が増強することが知られており、VEGF は虚血域のマーカー蛋白となりうる。そこで Bcl-2 蛋白の発現増強と hypoxia の関係を検討するために、連続切片で VEGF の免疫染色強度を Bcl-2 陽性癌細胞の存在する領域と存在しない領域で比較する。さらに細胞増殖期抗原 Ki-67 と癌抑制遺伝子 p53 の免疫染色を行い、TAE が腫瘍にどのような性質の変化を及ぼしたかを検討する。

## 【研究方法】

対象は TAE 後に切除された HCC 症例（TAE 施行例）12 例と、TAE を施行せずに切除された HCC 症例（TAE 非施行例）11 例。各症例の手術標本の連続切片に対し、Bcl-2、VEGF、Ki-67、p53 の免疫染色を間接酵素抗体法で行った。Bcl-2、p53、Ki-67 陽性細胞率を癌細胞 1000 個当たりの陽性細胞数として症例毎に算出し、症例を TAE の有無に分け比較した。Bcl-2 陽性細胞の存在する領域と存在しない領域における VEGF の発現量を比較するために以下のことを行った。

- 1) Bcl-2 陽性・陰性領域の定義：Bcl-2 陽性細胞を視野の中央に置いた光顕下の 200 倍視野を Bcl-2 陽性領域、Bcl-2 陽性細胞が存在せず、Bcl-2 陽性領域と重ならない 200 倍視野を Bcl-2 陰性領域とした。
- 2) VEGF 染色強度の測定：Bcl-2、VEGF 免疫染色は連続切片で行った。VEGF を染色した標本上の Bcl-2 陽性・陰性領域を Adobe Photoshop に取り込み、この画像を NIH image 1.52 上に展開する。無作為に選んだ 40 個の細胞の細胞質をトレースすると単位面積あたりの染色強度が測定される（実測値）。異なる標本で染色強度を比較するため、VEGF 染色強度＝実測値÷同一標本上の非癌部肝細胞の平均実測値とした。非癌部肝細胞の VEGF 平均実測値は 200 個の肝細胞の実測値から算出した。Bcl-2 陽性症例では各症例毎に Bcl-2 陰性・陽

性領域を5領域選び、Bcl-2陰性症例では陰性領域を5領域選んだ。1領域につき40個の肝癌細胞についてVEGF染色強度の測定、算出を行った。1領域毎に細胞のVEGF染色強度の平均値を算出した。

## 【研究結果】

対象にしたTAE施行例と非施行例の生存率をKaplan-Meier法で算出したところ、有意差は認めなかったがTAE施行例の生存率の方が低い傾向にあった。Bcl-2陽性症例はTAE症例12例中7例、TAE非施行11例中2例にみられた。TAE施行Bcl-2陽性7例中6例は集簇陽性、1例は孤立性陽性であった。TAE非施行Bcl-2陽性例は2例とも孤立性陽性であった。Bcl-2陽性細胞率はTAE施行例では $41.8 \pm 15.1$ 細胞/1000細胞、TAE非施行例では $1.0 \pm 0.8$ であり、TAE施行例の方が有意に高値であった ( $p=0.0231$ )。VEGF染色強度はBcl-2陽性領域では $1.028 \pm 0.091$ 、Bcl-2陰性領域では $1.071 \pm 0.017$ を示し、Bcl-2陽性領域が有意に高値であった ( $p=0.0222$ )。TAE施行例に限って検討すると、Bcl-2陽性領域で $1.296 \pm 0.126$ 、陰性領域で $1.066 \pm 0.024$ と陽性領域の方が有意に高値であったが ( $p=0.0186$ )、TAE非施行例では陽性領域 $1.033 \pm 0.083$ 、陰性領域 $1.075 \pm 0.024$ と有意差はみられなかった ( $p=0.5247$ )。さらに、Bcl-2陽性領域を集簇陽性領域と孤立性陽性領域に分けて比較すると、前者が $1.452 \pm 0.148$ 、後者が $0.964 \pm 0.061$ であり、集簇陽性領域の方が有意に高値であった ( $p=0.0049$ )。Ki-67陽性細胞率はTAE施行例で $67.0 \pm 30.2$ 、TAE非施行例で $49.2 \pm 22.0$ であり、有意差を認めなかった ( $p=0.7818$ )。p53陽性細胞率はTAE施行例で $128.0 \pm 72.2$ 、TAE非施行例で $84.9 \pm 80.1$ であり、同様に有意差を認めなかった ( $p=0.2417$ )。

## 【結 論】

TAE施行後の肝細胞癌組織にBcl-2蛋白陽性肝細胞癌の集簇を認め、この部にVEGF蛋白発現の増強を認めた。以上の結果より、TAEによるhypoxiaあるいはTAE後におこるreoxygenationによって、生き残った肝癌細胞にBcl-2蛋白の発現が誘導されと考えられた。Bcl-2蛋白発現の誘導により、再発肝細胞癌の性質が変化する可能性が示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

今までの報告によれば、肝細胞癌（HCC）の Bcl-2 蛋白の発現率は 13.5%と低く、Bcl-2 陽性症例でも少数の陽性癌細胞が腫瘍内に散在して認められるのみであった。本研究でも肝動脈塞栓療法（TAE）非施行群では Bcl-2 蛋白の発現率は 18.1%と低く、陽性癌細胞の存在パターンも過去の報告と同じであった。しかし TAE 施行群では Bcl-2 蛋白の発現率は 58.3%と高く、しかも TAE 施行群の Bcl-2 陽性症例 7 例中 6 例では陽性癌細胞がいくつかの領域に集簇して存在していた。この結果は新しい知見である。その Bcl-2 蛋白発現の機序として、VEGF 染色の結果から hypoxia が関与する可能性を示した。以上の本研究の結果は TAE による hypoxia（あるいは TAE 後におこる reoxygenation）が癌細胞に Bcl-2 蛋白の発現を誘導した可能性を示唆する初めての報告である。HCC で Bcl-2 蛋白の発現を誘導する因子について検討されたことはない。臨床的に TAE には、高い局所再発率、腫瘍の性質の変化、外科的切除以前に TAE を行う方法による生存率の悪化などの問題が存在するが、その原因となる蛋白について検討されたことはない。一方、過去の報告から Bcl-2 蛋白は genomic aberration を集積させ、癌の malignant progression に関与すると推測されている。本研究で示された Bcl-2 蛋白の発現増強は TAE 後の HCC の変化を説明し得る初めての報告であり、現在広く行われている TAE に対する理解をさらに深める重要な臨床研究である。以上より本論文は学位論文に十分値すると考えられる。